

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250624.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250624.1250.004>

TrxA基因对类鼻疽伯克霍尔德菌生物学活性的影响

李欣泽, 刘双媛, 宋兆杰, 夏乾峰[✉], 李雪霞[✉]

(海南医科大学热带医学院, 国家卫生健康委员会热带病防治重点实验室, 海南 海口 571199)

[摘要] **目的:** 探讨 TrxA 在类鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*) 中的生物功能, 重点探究 TrxA 对 *B. pseudomallei* 生物活性的影响。 **方法:** 采用同源重组技术构建 TrxA 基因缺失 (Δ TrxA) 株, 并通过电击转化获得回补 (Δ TrxA::TrxA) 株, 以野生型 (wild type, WT) *B. pseudomallei* 为对照, 系统性评估三株菌在生长能力、运动性、生物膜形成、抗药性、氧化应激能力及感染能力几大方面的差异。具体实验包括: 生长曲线检测、点板法与面积测量法评估运动性、结晶紫染色法检测生物膜形成、药敏板测定抗药谱、Kirby-Bauer 法评估氧化应激耐受性, 以及利用菌落计数与 CCK-8 法分析细菌对宿主细胞的黏附和毒性。 **结果:** 与 WT 和 Δ TrxA::TrxA 株相比, Δ TrxA 株的生长速度明显减缓、运动能力明显降低 ($P < 0.05$); 对宿主细胞感染能力和毒性也明显降低 ($P < 0.05$)。在生物膜形成方面, Δ TrxA 株在 24 h 内形成的生物膜较 WT 增强, 但至 72 h 时三者差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Δ TrxA 株对部分抗生素的耐受性增强; 而三者对过氧化氢的氧化应激能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 上述结果表明 TrxA 在 *B. pseudomallei* 生物活性及对宿主的感染与毒性发挥方面具有重要作用。 **结论:** TrxA 在调控 *B. pseudomallei* 的生长、运动性、生物膜形成、感染能力及毒性发挥等方面发挥了关键作用, 本研究为进一步阐明 *B. pseudomallei* 的致病机制及开发新的治疗靶点提供了理论基础。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德菌; 生物活性; 感染; TrxA 蛋白

[中图分类号] R378 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)17-1281-09

Effects of the TrxA gene on the biological activities of *Burkholderia pseudomallei*

LI Xinze, LIU Shuangyuan, SONG Zhaojie, XIA Qianfeng[✉], LI Xuexia[✉]

(National Health Commission Key Laboratory of Tropical Disease Control, School of Tropical Medicine, Hainan Medical University, Haikou, 571199, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060001); Hainan Medical University Student Innovation and Entrepreneurship Project (S202411810006)

[Author]: LI Xinze, E-mail: xinze_li0533@163.com; LIU Shuangyuan, E-mail: 3629790466@qq.com.

[Correspondence to]: LI Xuexia, Ph.D., Associate Professor, E-mail: xxiali@yeah.net; XIA Qianfeng, Ph.D., Professor, E-mail: xiaqianfeng@muh.edu.cn.

Received: 2025-02-27 Revised: 2025-05-29

JHMu, 2026;32(17):1281-1289

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the biological function of TrxA in *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*), with a focus on exploring the role of TrxA in regulating *B. pseudomallei*'s biological activities. **Methods:** A TrxA gene deletion mutant (Δ TrxA) was constructed using homologous recombination, and a complemented strain (Δ TrxA::TrxA) was obtained via electroporation. Using the wild-type (WT) *B. pseudomallei* strain as a control, systematically evaluated differences among the three strains in terms of growth, motility, biofilm formation, antibiotic resistance, oxidative stress tolerance, and infectivity. Specific assays included: growth curve analysis, point plate and area measurement methods were used to evaluate motility, crystal violet staining was used to detect biofilm formation, drug sensitivity plate was used to test antibiotic susceptibility, the Kirby-Bauer method was used to evaluate oxidative stress tolerance, and colony counting and CCK-8 assays were used to assess bacterial adhe-

[基金项目] 国家自然科学基金(82060001);海南医科大学大学生创新创业项目(S202411810006)

[作者简介] 李欣泽, E-mail: xinze_li0533@163.com; 刘双媛, E-mail: 3629790466@qq.com。

[通讯作者] 李雪霞, 博士, 副教授, E-mail: xxiali@yeah.net; 夏乾峰, 博士, 教授, E-mail: xiaqianfeng@muh.edu.cn。

[收稿日期] 2025-02-27 **[修回日期]** 2025-05-29 **网络出版时间:** 2025-06-24 17:00:31

sion and cytotoxicity to the host cells. **Results:** Compared to the WT and $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ strains, the ΔTrxA mutant exhibited significantly reduced growth and motility ($P<0.05$), as well as significantly decreased infectivity and cytotoxicity toward the host cells ($P<0.05$). Regarding biofilm formation, the ΔTrxA strain formed a more robust biofilm than the WT strain at 24 hour. However, by the 72 hour, no statistical significant differences were observed among the three strains ($P>0.05$). The ΔTrxA strain showed increased resistance to certain antibiotics, while there were no statistical significant differences in tolerance to oxidative stress induced by hydrogen peroxide among all three strains ($P>0.05$). These findings suggested that TrxA plays a critical role in *B. pseudomallei*'s biological activity, as well as infectivity and cytotoxic against the host cells. **Conclusion:** TrxA plays a key role in regulating the growth, motility, biofilm formation, infectivity, and cytotoxicity of *B. pseudomallei*. This study provides a theoretical basis for further elucidating the pathogenic mechanisms of *B. pseudomallei* and developing novel therapeutic targets.

[Key words] *Burkholderia pseudomallei*; Biological activity; Infection; TrxA protein

类鼻疽是一种由革兰氏阴性杆菌类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*)引起的人畜共患传染病^[1],广泛流行于东南亚和澳大利亚等热带地区^[2]。在我国,该病主要分布于海南、广东和广西等南方沿海地区^[3,4],尤其在夏季台风和暴雨频发的环境中更易暴发流行^[2,5],严重威胁人民生命健康。类鼻疽的临床表现复杂多变,可表现为轻微的局部感染、肺炎,也可迅速发展为败血症,甚至导致死亡^[6,7],其病死率极高。由于 *B. pseudomallei* 具备天然高度耐药性,以及复杂的致病机制,且目前尚无有效疫苗,该病已被世界多国列为潜在生物武器,成为全球公共卫生领域亟待应对的重要威胁之一^[8,9]。在 *B. pseudomallei* 感染宿主的过程中,宿主的先天免疫系统会通过氧化爆发产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),如过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子和羟基自由基,以破坏入侵病原体的DNA、蛋白质和脂质,发挥清除作用^[10,11]。而 *B. pseudomallei* 为了在氧化应激环境中存活,进化出了包括硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)系统和谷胱甘肽系统等在内的多种抗氧化防御系统^[12],使其能够在宿主胞内维持还原状态,从而有效抵御ROS介导的氧化损伤。此外,研究还发现氧化应激不仅是生存挑战,也可作为信号调控细菌的毒力表达^[13,14];同时,还可诱导包括 TrxA、AhpC 和 KatG 在内的多种与抗氧化与毒力相关的蛋白表达,从而提升其整体致病性^[15]。

TrxA 蛋白作为 Trx 系统中的核心成分之一,扮演着关键的氧化还原调控角色。TrxA 通常为 12 kDa 的小分子硫醇-二硫还原酶,在众多细菌中广泛存在。它不仅能参与蛋白质二硫键的还原,维持细胞的氧化还原平衡,还在调控运动相关因子、促进病原体黏附上皮细胞及调节其他毒力因子表达等过程中发挥重要作用^[16]。研究显示,在幽门螺杆菌中,TrxA 缺失会使菌株对氧化损伤更为敏感,导致活力下降并明显削弱其在小鼠胃中的定植能力^[17];

在鼠伤寒沙门氏菌中,TrxA 是沙门氏菌致病岛 2 (Salmonella pathogenicity island 2, SPI-2) 编码的Ⅲ型分泌系统正常功能所必需,TrxA 缺失后, SPI-2 无法有效增强毒力,表明 TrxA 是其胞内致病作用的重要调控因子^[18];在结核分枝杆菌中,ctpD 可能通过调控金属离子供应参与 TrxA 的金属化和功能激活,二者共同构成应对氧化还原应激的重要系统,对结核分枝杆菌的体内生存和毒力具有重要作用^[19]。在牛分枝杆菌卡介苗 Tokyo172 株中,Ⅰ型亚克隆相较于Ⅱ型在应对 H_2O_2 诱导的氧化应激时表现出更强的抗性,且相关抗氧化应激基因(包括 TrxA)的表达水平明显上调^[20]。以上研究共同表明,TrxA 参与多种病原体中的氧化应激反应,并协同毒力因子增强细菌的存活与致病能力,具有重要的研究与应用价值。然而,目前关于 TrxA 在 *B. pseudomallei* 中的具体功能及其与致病性的关系有待进一步系统性研究。本研究旨在探讨 TrxA 对 *B. pseudomallei* 生物活性、对 *B. pseudomallei* 感染能力及对宿主毒性的影响,为揭示其在 *B. pseudomallei* 致病机制中的潜在作用提供理论基础,为类鼻疽防治提供新的理论依据和潜在的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞 本研究中所用野生株(wild type, WT)为 HNB001,由本实验室从海南临床类鼻疽患者体液样本中分离获得,并由本实验室保存,缺失株(ΔTrxA)、回补株($\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$)由本实验构建;A549 细胞购于美国生物标准品资源中心。

1.1.2 主要仪器与试剂 生物安全柜(HEAL FORCE);多功能酶标仪(Biotek);电转仪和电转杯(Bio-Rad);二氧化碳培养箱(PHCbi);普通显微镜(Motic);BamH I 和 Xba I 限制性内切酶(NEB);无缝克隆试剂 ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme);甲氧苄啶和庆大霉素(Biafrox);1% 结

晶紫 (Solarbio); 胎牛血清 (Gibco); DMEM 高糖培养基 (Gibco); PBS 缓冲液 (biosharp); CCK-8 试剂盒 (上海百赛生物); 药敏指示板 (美华)。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5'~3')
<i>TrxA</i> 上游	F:ACATGATTACGAATTCGTTCTCGAACATGATCTTGTGTTTCGAGGCC R:TTGACCCAAACCGGATGCGCCCCG
<i>TrxA</i> 下游	F:TCCGGTTTGGGTCAATACCTCTTTCGGTTCGGG R:CGACTCTAGAGGATCCGTGCCGATCGGAGAAGCGAAGC
<i>TrxA</i> 回补	F:GTACCCGGGGATCCTATGAGCGAACAGATCAAACACATCAGCGAC R:CGACGGCCAGTGCCATTAGAGATGGCTGTCCAGGAACGCG

1.2 方法

1.2.1 构建 *TrxA* 缺失株、回补株 为构建 *B. pseudomallei* 的 $\Delta TrxA$ 株, 首先以 *B. pseudomallei* 基因组为模板, 通过表 1 中 *TrxA* 上游、下游两对引物, 利用 PCR 扩增获得 *TrxA* 基因上游和下游约 600 bp 的同源臂片段。将两段同源臂通过无缝克隆技术连接至携带蔗糖敏感基因 (*sacB*) 的自杀质粒 pK18mobSacB 上, 构建重组载体 pK18- $\Delta TrxA$ 。构建完成的重组质粒经热激法转化至大肠杆菌 S17- λ pir 感受态细胞, 通过双亲接合法将 pK18- $\Delta TrxA$ 导入 *B. pseudomallei* 中。在含 15% 蔗糖浓度的选择性培养基上进行筛选, 利用 pK18-mobSacB 的蔗糖敏感性, 筛选出已完成第二次同源重组、实现 *TrxA* 基因敲除的突变株。通过 PCR 和基因测序验证目标基因已成功敲除, 获得 $\Delta TrxA$ 株。

在 *TrxA* 回补株的构建中, 首先通过表 1 中 *TrxA* 回补引物, 以 *B. pseudomallei* 基因组为模板, PCR 扩增获得 *TrxA* 基因片段, 并将其连接至 PUCP28T 质粒上, 构建回补质粒 PUCP28T-*TrxA*。以对数生长期的 $\Delta TrxA$ 株为材料制备感受态细胞: 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 弃去上清后用 4 °C 预冷无菌水洗涤菌体, 重复 3 次。最后一次洗涤后, 将菌体重悬于 100 μ L 无菌水中, 即为 *B. pseudomallei* 感受态细胞。取 10 μ L 构建好的回补质粒加入 *B. pseudomallei* 感受态菌液中, 置于冰上孵育 30 min 后, 在 2.5 kV 条件下进行电击转化。电击完成后立即加入 900 μ L LB 培养基混匀, 转移至 15 mL 离心管中, 在 37 °C、80 r/min 条件下的摇床中复苏培养 3 h。室温 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌液, 弃 900 μ L 上清, 保留 100 μ L 重悬菌体。重悬菌体全部涂布到含有 100 μ g/mL 甲氧苄啶和 100 μ g/mL 庆大霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 静置培养 24 h, 挑取单菌落, 通过 PCR 验证是否回补成功。

1.1.3 实验所需引物 本实验用于构建 $\Delta TrxA$ 和 $\Delta TrxA::TrxA$ 株的引物序列见表 1。

1.2.2 生长曲线的测定 分别挑取 WT、 $\Delta TrxA$ 及 $\Delta TrxA::TrxA$ 株的单个菌落, 接种于 5 mL LB 液体培养基中, 其中 $\Delta TrxA::TrxA$ *B. pseudomallei* 株培养基中需额外加入 5 μ L 甲氧苄啶抗生素。随后, 将各菌液置于 37 °C、220 r/min 条件下摇床培养 12~18 h。次日按 1:100 体积比进行传代培养, 直至菌液 OD₆₀₀=0.5。随后, 采用新鲜 LB 培养基将菌液稀释至 OD₆₀₀=0.01, 并将各株菌液各取 200 μ L 接种于 96 孔板中, 每种菌株设置 3 个复孔。将 96 孔板置于多功能酶标仪中, 于 37 °C 条件下进行连续监测, 以绘制细菌生长曲线。

1.2.3 泳动能力的测定 *B. pseudomallei* 的培养与传代方法同前述。传代后将菌液稀释至 OD₆₀₀=0.1, 取 2 μ L 菌液滴加于 0.3% 琼脂的 LB 蔗糖琼脂平板中央。将平板置于 37 °C 培养箱中静置培养, 并分别于 24、48、72 h 测量并记录泳动圈面积大小, 以评估细菌的运动能力。

1.2.4 生物膜形成能力的测定 *B. pseudomallei* 的培养与传代方法同前述。传代后将菌液稀释至 OD₆₀₀=0.1, 取 2 mL 菌液接种于无菌玻璃试管和 24 孔板中, 在 37 °C 静置培养。分别于 24、48、72 h 观察并记录生物膜形成情况, 结合结晶紫染色法对生物膜形成量进行定量测定。在采用结晶紫染色法测定生物膜形成能力时, 当培养达到设定时间后, 缓慢吸除 24 孔板中的菌液, 并使用 PBS 轻轻洗涤黏附在培养孔中的生物膜 3 次。加入 2 mL 甲醇 4 °C 固定过夜。吸出甲醇并再次用 PBS 洗涤孔板 3 次后, 加入 1% 结晶紫溶液室温染色 20 min, 去除多余染料并用 PBS 洗涤 3 次。最后加入 33% 乙酸溶解附着在孔底和孔壁上的结晶紫染料, 取 200 μ L 溶液转移至 96 孔板中, 在 OD=595 nm 波长下测定吸光度。

1.2.5 细菌耐药性的测定 挑取多个单菌落接种于稀释液中, 调节至 0.5 麦氏比浊度后, 取 50 μ L 菌

悬液加入 Mueller-Hinton (MH) 肉汤中充分混匀。将配制好的菌液各取 100 μ L 滴加至美华药敏指示板各孔中。密封后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 18 h。培养结束后观察各孔颜色及沉淀情况判断最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 评估菌株的耐药性。

1.2.6 细菌黏附能力的比较 *B. pseudomallei* 的培养与传代方法同前述。以 MOI=50 感染 A549 细胞 1 h 后, 用 PBS 冲洗细胞 3 次, 去除游离在培养皿上的 *B. pseudomallei*。弃去 PBS 后用 1 mL 0.1% TritonX-100 裂解细胞并孵育 5 min, 以回收附着在 A549 细胞表面的 *B. pseudomallei*, 将裂解液收集到 EP 管中经倍比稀释后涂布在无抗 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 计数单菌落数量。

1.2.7 细胞存活实验 *B. pseudomallei* 的培养与传代方法同前述。将 1×10^4 个 A549 细胞接种于 96 孔板各孔中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 弃原有培养基, 更换为无血清培养基, 并按 MOI=50 的比例加入 *B. pseudomallei* 菌液感染细胞, 感染时间为 16 h。PBS 洗涤 3 次终止感染后加入 CCK-8 工作液并孵育 30 min, 最后通过酶标仪测定 450 nm 波长下的吸光度值, 进而评估被 *B. pseudomallei* 感染细胞的存活率。

1.2.8 氧化应激能力的测定 *B. pseudomallei* 的培养与传代方法同前述。传代后将菌液稀释至 $\text{OD}_{600}=0.1$ 。利用棉签取少量菌液并均匀涂布于 MH 板, 在 MH 上放置无菌空白药敏纸片, 并将 10 μ L 的 0.1% H_2O_2 滴加在空白药敏纸片上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

1.2.9 统计学处理 使用 GraphPad Prism 10 软件进行统计学分析。组内比较采用配对 *t* 检验, 组间比较则采用非配对 *t* 检验。多组数据比较使用单因素方差分析进行显著性检验。本研究各实验独立重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

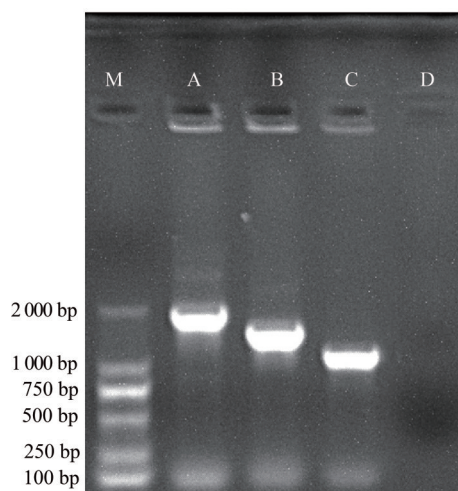
2 结果

2.1 TrxA 缺失株、回补株的验证

利用同源重组与电击转化的方法成功构建了 ΔTrxA 株与 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 株, 利用琼脂糖电泳与基因测序进行验证, 见图 1。

2.2 TrxA 影响 *B. pseudomallei* 的生长

在 37 $^{\circ}$ C 条件下, ΔTrxA 株与 WT 的生长曲线存在明显差异。与 WT 相比, ΔTrxA 的生长速度明显减缓, 其生长对数期起始时间由第 8 小时延迟至第 14 小时。值得注意的是, 在培养至第 40 小时后, ΔTrxA 与 WT 的生长曲线出现重合, 并在此之后



M: DNA marker; A: WT 类鼻疽伯克霍尔德菌株; B: ΔTrxA 类鼻疽伯克霍尔德菌株; C: $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 类鼻疽伯克霍尔德菌株; D: 阴性对照

图 1 ΔTrxA 和 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 类鼻疽伯克霍尔德菌株琼脂糖电泳验证图

Fig 1 Validation plot of agarose electrophoresis of ΔTrxA and $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ *Burkholderia pseudomallei* strains

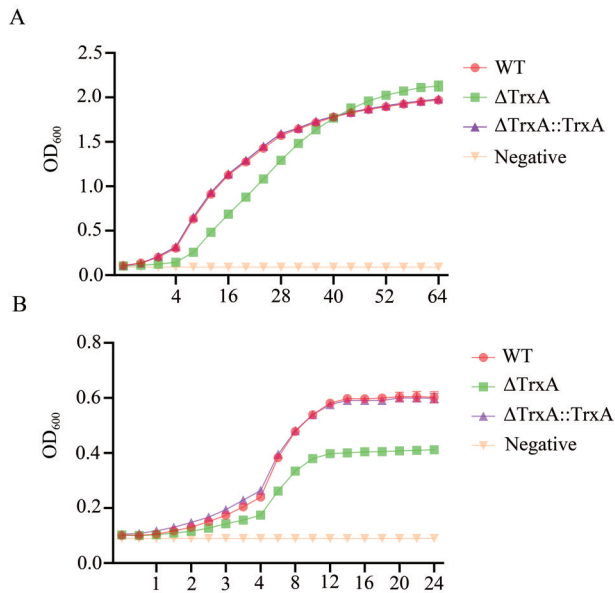
ΔTrxA 的生长水平逐渐超过 WT, 而 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 的生长曲线与 WT 基本重叠。表明在正常生长温度下, TrxA 在 *B. pseudomallei* 生长前期具有调控作用, 而随着继续生长, *B. pseudomallei* 可能通过其他基因来应对 TrxA 的缺失, 加速生长。但在 42 $^{\circ}$ C 高温胁迫条件下, ΔTrxA 株的生长速度明显低于 WT 和 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 株, 始终处于劣势, 表明 TrxA 的缺失明显削弱了 *B. pseudomallei* 对高温环境的适应生长能力, 见图 2A、B。

2.3 ΔTrxA 减弱 *B. pseudomallei* 株运动能力

为评估 TrxA 对 *B. pseudomallei* 运动能力的影响, 对 WT、 ΔTrxA 及 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 株在 24、48、72 h 时的泳动能力分别进行了检测和测量分析。实验结果显示, 在上述 3 个时间点, ΔTrxA 的泳动圈面积明显小于 WT 和 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 株 ($P < 0.05$)。相比之下, $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 株的泳动能力与 WT 基本一致。上述结果表明, TrxA 的缺失明显削弱了 *B. pseudomallei* 的运动能力, 提示 TrxA 在调控 *B. pseudomallei* 运动性方面可能发挥关键作用, 见图 3A、B。

2.4 ΔTrxA 增强 *B. pseudomallei* 株生物膜形成能力

采用试管观察和吸光度测定比较 WT、 ΔTrxA 及 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 株的生物膜形成能力, 并进行统计分析。结果显示在 24 h, ΔTrxA 株的生物膜形成



A:3种菌株在37 °C条件下的生长曲线;B:3种菌株在42 °C条件下的生长曲线

图2 WT、 Δ TrxA、 Δ TrxA::TrxA类鼻疽伯克霍尔德菌株生长曲线

Fig 2 Growth curves of WT, Δ TrxA, and Δ TrxA::TrxA *Burkholderia pseudomallei* strains

量明显高于WT与 Δ TrxA::TrxA株($P<0.0001$)。然而,到48 h及72 h时, Δ TrxA的生物膜形成量与其在24 h时相当,未见增加;WT与 Δ TrxA::TrxA株的生物膜形成量随时间延长而持续增加。直至72 h三者之间的生物膜形成量差异无统计学意义($P>0.05$)。该结果提示TrxA在*B. pseudomallei*生物膜形成过程中可能发挥阶段性负调控作用。

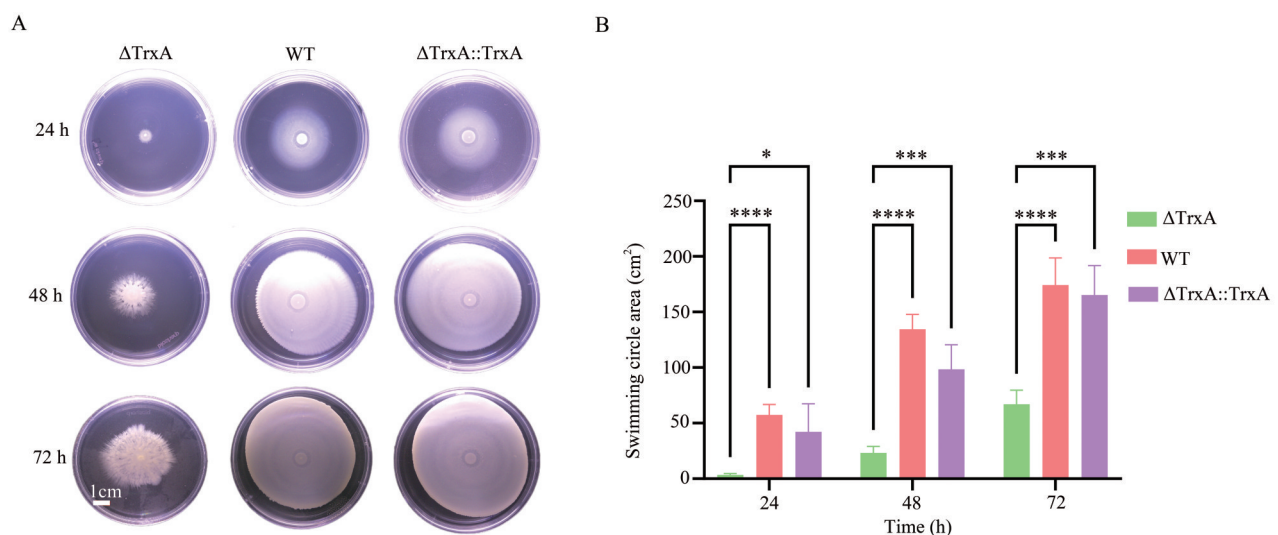
TrxA缺失后,细菌可能通过调节氧化还原状态或激活补偿性应答机制,在早期(24 h)促进生物膜的迅速形成,但其后续增强能力受限。相比之下,WT与 Δ TrxA::TrxA株则表现出生物膜逐步累积的趋势,最终在72 h达到与 Δ TrxA相当的水平。TrxA可能通过调控胞外多糖合成或信号转导等机制,在生物膜形成的时间进程中发挥调节作用,其缺失可能导致生物膜形成提前激活但持续性不足,见图4A~C。

2.5 TrxA调控*B. pseudomallei*的耐药性

在对WT、 Δ TrxA、 Δ TrxA::TrxA株进行药物敏感性比较的实验结果显示, Δ TrxA株对头孢类抗生素的MIC较WT株明显升高,耐药性增强,MIC值约为WT的2倍。此外, Δ TrxA对阿米卡星和氨基糖苷的MIC也出现约2倍的升高。尽管在部分抗生素中, Δ TrxA::TrxA的敏感性恢复至与WT相当,但在头孢类抗生素中并未完全恢复原始敏感性,仍存在一定程度的耐药性升高。整体来看,TrxA的缺失降低了*B. pseudomallei*对多种抗生素的敏感性,而TrxA的回补未能完全逆转该表型,推测质粒回补的TrxA未能在*B. pseudomallei*抗药性方面发挥功能,但*B. pseudomallei*染色体上本身的TrxA在调控*B. pseudomallei*对抗生素敏感性过程中发挥一定作用,见表2。

2.6 Δ TrxA*B. pseudomallei*株对宿主细胞的黏附能力减弱

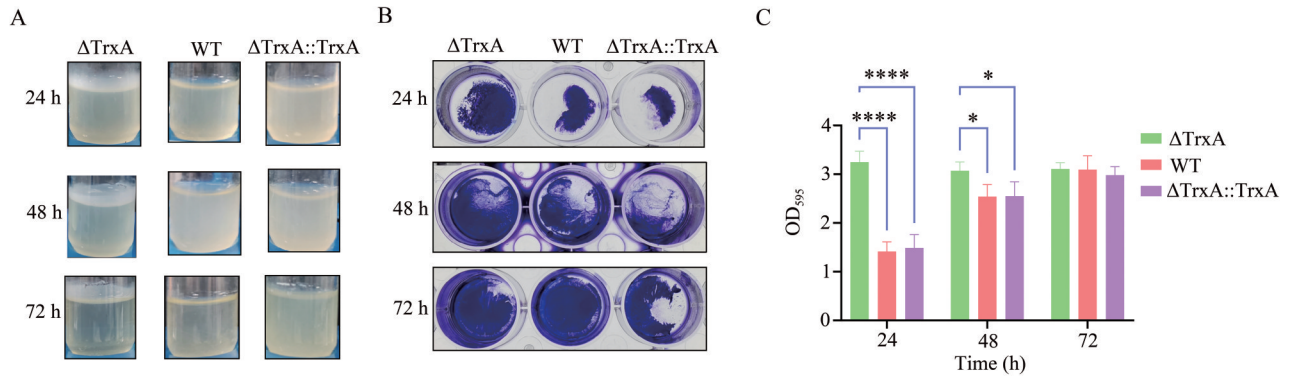
比较WT、 Δ TrxA及 Δ TrxA::TrxA株对宿主细胞黏附能力的实验结果显示,在以MOI=50感染



A:3种菌株在24、48、72 h时的泳动面积;B:3种菌株在24、48、72 h时泳动所产生面积统计分析; * $P<0.05$, ** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图3 WT、 Δ TrxA、 Δ TrxA::TrxA类鼻疽伯克霍尔德菌株泳动圈面积的比较

Fig 3 Comparison of swimming circle areas of WT, Δ TrxA, and Δ TrxA::TrxA *Burkholderia pseudomallei* strains



A:3种菌株在24、48、72 h时的生物膜形成情况(试管观察法);B:3种菌株在24、48、72 h时的生物膜形成情况(结晶紫染色吸光度测定法);C:3种菌株在24、48、72 h时生物膜生成量的定量统计分析;* $P<0.05$,**** $P<0.0001$

图4 WT、 Δ TrxA、 Δ TrxA::TrxA类鼻疽伯克霍尔德菌株生物膜形成能力的比较

Fig 4 Comparison of biofilm formation capacity of WT, Δ TrxA, and Δ TrxA::TrxA *Burkholderia pseudomallei* strains

表2 WT、 Δ TrxA、 Δ TrxA::TrxA类鼻疽伯克霍尔德菌株药敏最小抑菌浓度(μ g/mL)

Tab 2 Minimum inhibitory concentration of drug sensitivity of WT, Δ TrxA, and Δ TrxA::TrxA *Burkholderia pseudomallei* strains (μ g/mL)

抗菌药物	Δ TrxA	WT	Δ TrxA::TrxA
头孢他啶	2	1	1
头孢吡肟	16	8	16
头孢曲松	8	4	8
米诺环素	<4	<4	4
四环素	>8	<4	>8
头孢噻肟	4	2	4
左氧氟沙星	<2	<2	2
环丙沙星	<1	<1	<1
哌拉西林	<8	<8	<8
庆大霉素	>16	>16	>16
妥布霉素	>16	>16	>16
哌拉西林/他唑巴坦	<4/<4	<4/<4	<4/<4
阿米卡星	64	32	32
多黏菌素B	>8	>8	>8
头孢哌酮/舒巴坦	4/2	<4/<2	<4/<2
替卡西林/克拉维酸	<8/<2	<8/<2	<8/<2
多黏菌素E	>8	>8	>8
氨苄西林/舒巴坦	<8/<4	<8/<4	<8/<4
氨曲南	16	4	8
多西环素	<4	<4	<4
氯霉素	8	<8	<8
亚胺培南	<1	<1	<1
美罗培南	1	<1	<1
复方新诺明	<2/<38	<2/<38	<2/<38

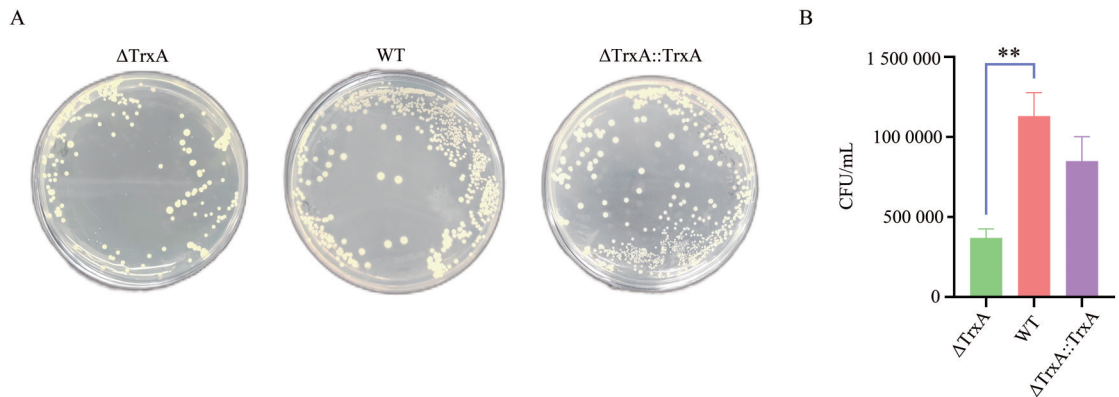
A549细胞1 h后,黏附到A549细胞上的 Δ TrxA的数量明显低于WT与 Δ TrxA::TrxA黏附到A549细胞上的数量,且计数统计发现其差异具有统计学意义($P<0.01$)。表明TrxA在*B. pseudomallei*黏附宿主细胞过程中可能发挥重要作用,其缺失明显削弱了*B. pseudomallei*对宿主细胞黏附能力,而该表型可通过TrxA的回补得到恢复,见图5A、B。

2.7 Δ TrxA减弱*B. pseudomallei*株对宿主细胞的毒性

CCK-8评估WT、 Δ TrxA及 Δ TrxA::TrxA株对宿主细胞毒性的实验结果显示,在以MOI=50感染A549细胞16 h后, Δ TrxA感染的细胞存活率约为65%,明显高于WT和 Δ TrxA::TrxA感染组(两者细胞存活率约为50%),且经统计分析后,其差异具有统计学意义($P<0.001$)。表明TrxA的缺失明显减弱了*B. pseudomallei*对宿主细胞的致损能力,而该表型可通过TrxA的回补得以恢复,提示TrxA在感染过程中协助*B. pseudomallei*对宿主产生毒性,见图6A、B。

2.8 Δ TrxA对*B. pseudomallei*氧化应激耐受性的影响不明显

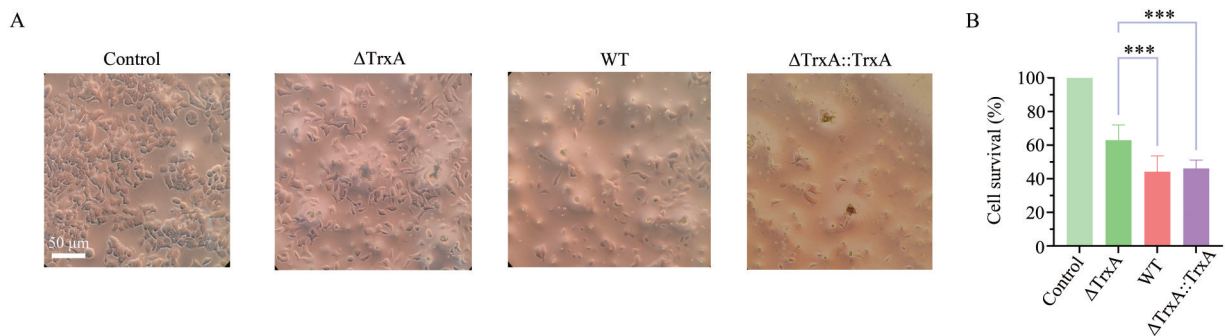
在氧化应激耐受性实验中,采用Kirby-Bauer(K-B)纸片扩散法对WT、 Δ TrxA及 Δ TrxA::TrxA株进行了抑菌圈测定。结果显示, Δ TrxA株与WT在氧化胁迫条件下形成的抑菌圈直径平均约为1.5 cm,其差异无统计学意义($P>0.05$)。 Δ TrxA::TrxA的结果与WT相当,其差异无统计学意义($P>0.05$),表明TrxA虽然在许多细菌中作为氧化还原系统的核心成分,但可能不参与*B. pseudomallei*对氧化条件的应激,见图7A、B。



A:3 种菌株在 $\text{MOI}=50$ 条件下分别感染 A549 细胞 1 h 后,黏附到 A549 细胞表面的类鼻疽伯克霍尔德菌数量;B:3 种菌株在 $\text{MOI}=50$ 条件下分别感染 A549 细胞 1 h 后,黏附到 A549 细胞表面的类鼻疽伯克霍尔德菌数量统计分析; ** $P<0.01$

图 5 WT、 ΔTrxA 、 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 类鼻疽伯克霍尔德菌株黏附能力的比较

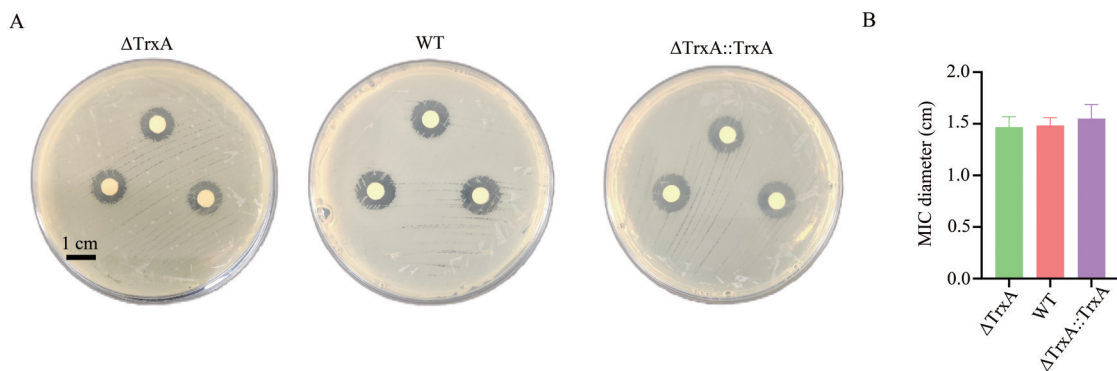
Fig 5 Comparison of the adhesion capacity of WT, ΔTrxA , and $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ *Burkholderia pseudomallei* strains



A:3 种菌株以 $\text{MOI}=50$ 感染 A549 细胞 16 h 后镜下 ($200\times$) 情况;B:3 种菌株以 $\text{MOI}=50$ 感染 A549 细胞 16 h 后细胞存活率统计分析; *** $P<0.001$

图 6 WT、 ΔTrxA 、 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 类鼻疽伯克霍尔德菌株感染 A549 细胞能力的比较

Fig 6 Comparison of cell infection ability of WT, ΔTrxA , and $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ *Burkholderia pseudomallei* strains



A:3 种菌株对过氧化氢敏感性的抑菌圈直径;B:3 种菌株对过氧化氢敏感性的抑菌圈直径统计分析

图 7 ΔTrxA 、WT、 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 类鼻疽伯克霍尔德菌株对过氧化氢耐受情况

Fig 7 Hydrogen peroxide tolerance of ΔTrxA , WT, and, $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ *Burkholderia pseudomallei* strains

3 讨论

本研究系统性评估了 TrxA 在 *B. pseudomallei* 生物学表型中的功能,发现该蛋白在 *B. pseudomallei* 的多个关键表型中发挥重要作用,尤其涉及对生长、运动能力、对宿主细胞感染能力、对宿主毒性的影响。

结果表明, ΔTrxA 株在生长速率和泳动能力明显低于 WT 及 $\Delta\text{TrxA}::\text{TrxA}$ 株,提示 TrxA 对于 *B. pseudomallei* 的正常生理活动至关重要。这一结果与先前在 *Edwardsiella* 和 2 型猪链球菌中的研究结果一致^[21,22]。该表型现象可能源于 TrxA 在调控细胞内氧化还原稳态中的关键作用。作为典型的

硫氧还蛋白, TrxA 通过调节蛋白质的巯基二硫键状态, 维持多种蛋白的正常构象与功能, 其缺失可能导致依赖还原环境的代谢酶或结构蛋白失活, 进而影响细胞代谢、能量生成及鞭毛系统的组装与功能, 最终表现为生长速率降低及运动能力减弱。该现象提示 TrxA 在维持细菌正常生理过程中具有综合性的调控作用, 后续可通过蛋白组学或转录组学手段深入探讨其分子机制。但本论文的结果显示 TrxA 缺失未明显影响 *B. pseudomallei* 对外源性氧化应激的敏感性。尽管 TrxA 通常被认为是细菌抗氧化系统的关键组成部分^[23], 推测由于 *B. pseudomallei* 具备其他可替代 TrxA 功能的冗余抗氧化机制。现有研究也表明, *B. pseudomallei* 拥有多种氧化还原相关蛋白(如 TrxC、过氧化物酶、过氧化氢酶等)及 KatG、AhpC 等应激响应调控系统, 可在 TrxA 缺失时通过功能互补维持氧化还原平衡^[24-27]; 在对 2 型猪链球菌的研究中也发现 TrxA 并不参与氧化应激防御, 进一步支持 TrxA 在不同菌种中可能具有非典型功能^[28]。此外, K-B 法检测的是对胞外氧化剂的敏感性, 可能无法准确反映 TrxA 在胞内氧化还原稳态维持中的功能。因此, 该实验结果提示 TrxA 的抗氧化作用可能更多体现在菌内水平, 其在 *B. pseudomallei* 中的生物学功能或主要与胞内稳态调节及毒力调控等过程相关。

而对 A549 细胞的感染能力和毒性结果表明, Δ TrxA 在宿主细胞表面的黏附能力及其致病性明显下降。这提示 TrxA 可能通过调控与黏附相关的表面结构蛋白或分泌系统(如 III 型或 VI 型分泌系统), 在 *B. pseudomallei* 早期感染宿主过程中发挥关键作用。相关研究也支持这一推论: TrxA 在多种病原菌中被证实参与黏附、入侵和毒力因子的调控。例如, 在 2 型猪链球菌中, TrxA 缺失会明显降低细菌对上皮细胞的黏附能力及其在巨噬细胞内存活率^[22]; 在鲍曼不动杆菌中, TrxA 影响 IV 型菌毛相关基因表达, 间接调控定植能力^[29]; 在鼠伤寒沙门氏菌中, TrxA 对于三型分泌系统的活性至关重要, 尤其在吞噬细胞内, 其还原功能对该系统功能的正常发挥具有决定性作用^[18]; 而在爱德华氏菌中, TrxA 缺失则明显削弱了抗氧化能力、鞭毛形成和在宿主组织中的扩散能力^[21]。由此可见, TrxA 作为调控因子, 通过影响多条与细菌结构和功能相关的关键信号通路, 协调黏附、运动、免疫逃逸与毒力表达等多个过程, 在病原菌感染机制中发挥核心作用。

本实验发现 Δ TrxA 表现出增强的生物膜形成能力。这一现象与其运动性下降形成对照, 可能反映了细菌在应对氧化压力等不利环境时, 由游动状态向附着稳态的转变策略。生物膜通常有助于增强细菌的抗逆性和持久生存能力, 因此, TrxA 的缺失可能促使 *B. pseudomallei* 通过增强生物膜形成来弥补其环境适应性的不足, 体现了一种环境应答的代偿机制。

综上所述, TrxA 在调控细菌生长、运动、对宿主细胞的感染能力及毒性方面具有明显作用。本研究为深入理解 *B. pseudomallei* 的毒力调控机制及其环境适应策略提供了理论依据, 并提示 TrxA 有望成为类鼻疽防治的潜在分子靶点。未来研究可结合体内感染模型, 进一步阐明 TrxA 的分子调控机制及其在 *B. pseudomallei* 致病过程中的具体作用。

作者贡献度说明:

李欣泽与刘双媛贡献度一致: 设计实验、实施研究过程、数据分析; 夏乾峰: 实验指导、论文审阅; 李雪霞: 课题设计、论文审阅与修改; 宋兆杰: 参与实验、数据整理。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Li S, Xu L, Jiao Y, et al. Risk assessment of global animal melioidosis under current and future climate scenarios [J]. *Animals (Basel)*, 2025, 15(3): 455.
- Birnie E, Biemond JJ, Wiersinga WJ. Drivers of melioidosis endemicity: Epidemiological transition, zoonosis, and climate change [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2022, 35(3): 196-204.
- Shafiq M, Ke B, Li X, et al. Genomic diversity of resistant and virulent factors of *Burkholderia pseudomallei* clinical strains recovered from Guangdong using whole genome sequencing [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 980525.
- Zheng X, Xia Q, Xia L, et al. Endemic melioidosis in Southern China: Past and present [J]. *Trop Med Infect Dis*, 2019, 4(1): 39.
- Wu W, Shum MH, Wong IT, et al. Probable airborne transmission of *Burkholderia pseudomallei* causing an urban outbreak of melioidosis during typhoon season in Hong Kong, China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12(1): 2204155.
- Tran QT, Phan PH, Bui LN, et al. Child melioidosis deaths caused by *Burkholderia pseudomallei*-contaminated borehole water, Vietnam, 2019 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28(8): 1689-1693.

- 7 Yu A, Su L, Li Q, et al. Imaging and clinical manifestations of hematogenous dissemination in melioidosis [J]. BMC Med Imaging, 2024, 24: 296.
- 8 Broertjes J, Franz E, Friesema IH, et al. Epidemiology of pathogens listed as potential bioterrorism agents, the Netherlands, 2009-2019[J]. Emerg Infect Dis, 2023, 29 (7): 1-9.
- 9 Johnson MM, Ainslie KM. Vaccines for the prevention of melioidosis and glanders [J]. Curr Trop Med Rep, 2017, 4(3): 136-145.
- 10 Krakauer T. Inflammasomes, autophagy, and cell death: The trinity of innate host defense against intracellular bacteria[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 2471215.
- 11 Nan D, Rao C, Tang Z, et al. *Burkholderia pseudomallei* BipD modulates host mitophagy to evade killing [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 4740.
- 12 Ku JW, Gan YH. Modulation of bacterial virulence and fitness by host glutathione [J]. Curr Opin Microbiol, 2019, 47: 8-13.
- 13 Geng H, Su R, Tao Y, et al. RpoE orchestrates oxidative stress adaptation, virulence, and dual plant immune modulation in *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73(18): 10826-10839.
- 14 Wagner GE, Stanjek TF, Albrecht D, et al. Deciphering the human antibody response against *Burkholderia pseudomallei* during melioidosis using a comprehensive immunoproteome approach [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1294113.
- 15 Al-Maleki AR, Mariappan V, Vellasamy KM, et al. Enhanced intracellular survival and epithelial cell adherence abilities of *Burkholderia pseudomallei* morphotypes are dependent on differential expression of virulence-associated proteins during mid-logarithmic growth phase [J]. J Proteomics, 2014, 106: 205-220.
- 16 Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 66: 75-87.
- 17 Kuhns LG, Wang G, Maier RJ. Comparative roles of the two *Helicobacter pylori* thioredoxins in preventing macromolecule damage [J]. Infect Immun, 2015, 83(7): 2935-2943.
- 18 Negrea A, Bjur E, Puiac S, et al. Thioredoxin 1 participates in the activity of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system [J]. J Bacteriol, 2009, 191(22): 6918-6927.
- 19 Raimunda D, Long JE, Padilla-Benavides T, et al. Differential roles for the $\text{Co}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ transporting ATPases, CtpD and CtpJ, in *Mycobacterium tuberculosis* virulence [J]. Mol Microbiol, 2014, 91(1): 185-197.
- 20 Taniguchi K, Hayashi D, Yasuda N, et al. Comparative study of the susceptibility to oxidative stress between two types of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 [J]. mSphere, 2021, 6(2): e00111-e00121.
- 21 He J, Liu S, Fang Q, et al. The thioredoxin system in *Edwardsiella piscicida* contributes to oxidative stress tolerance, motility, and virulence [J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 827.
- 22 Zhao C, Jia X, Pan Y, et al. Thioredoxin A of *Streptococcus suis* serotype 2 contributes to virulence by inhibiting the expression of pentraxin 3 to promote survival within macrophages [J]. J Microbiol, 2023, 61(4): 433-448.
- 23 Zeller T, Klug G. Thioredoxins in bacteria: Functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes [J]. Naturwissenschaften, 2006, 93(6): 259-266.
- 24 Wong CF, Shin J, Subramanian Manimekalai MS, et al. AhpC of the mycobacterial antioxidant defense system and its interaction with its reducing partner Thioredoxin-C [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5159.
- 25 Zhang B, Gu H, Yang Y, et al. Molecular mechanisms of AhpC in resistance to oxidative stress in *Burkholderia thailandensis* [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1483.
- 26 Loprasert S, Whangsuk W, Sallabhan R, et al. Regulation of the *katG-dpsA* operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei* exposed to oxidative stress [J]. FEBS Lett, 2003, 542 (1-3): 17-21.
- 27 Bzdyl NM, Moran CL, Bendo J, et al. Pathogenicity and virulence of *Burkholderia pseudomallei* [J]. Virulence, 2022, 13(1): 1945-1965.
- 28 Ji C, Pan Y, Liu B, et al. Thioredoxin C of *Streptococcus suis* serotype 2 contributes to virulence by inducing antioxidative stress and inhibiting autophagy via the MSR1/PI3K-Akt-mTOR pathway in macrophages [J]. Vet Microbiol, 2024, 298: 110263.
- 29 Yao Y, Chen Q, Zhou H. Virulence factors and pathogenicity mechanisms of *Acinetobacter baumannii* in respiratory infectious diseases [J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(12): 1749.

[本文编辑] 陈思润